

遺伝子診断とその問題点

伊 藤 道 徳

徳島大学医学部小児科学講座

(平成12年9月18日受付)

はじめに

従来疾患の診断は、症状による診断法、化学診断法、生理学的診断法、画像診断法、病理診断法などにより行われてきたが、近年の遺伝子工学的手法の進歩により種々の疾患の病因遺伝子および疾患関連遺伝子が同定され、さらにこれらの疾患の分子遺伝学的解析により臨床的分野においても遺伝子診断法が急速に取り入れられてきている。現在遺伝子診断の対象となっている疾患には、遺伝性疾患、染色体異常症、奇形症候群、悪性腫瘍などがあるが、遺伝子の異常により生じるこれらの疾患を遺伝子診断により診断することは極めて論理的な方法である。本稿では、これらの疾患のうち遺伝性疾患を中心として、現在遺伝子診断においてよく用いられている方法について概説し、これらの疾患の遺伝子診断の利点とその問題点について述べる。

遺伝子診断法

現在遺伝子診断に用いられている主な手法¹⁾を表1に示す。このうち遺伝性疾患の遺伝子診断にはポリメラーゼ連鎖増幅法(PCR法)を用いた変異遺伝子検出法がよく用いられている。患者における遺伝子変異を最も確実に同定し診断する方法は、核酸塩基配列決定法(シーケンス)である。PCR法により病因遺伝子のcDNAまたはゲノムDNAを増幅し、PCR産物をクローニング後、または直接その塩基配列をシーケンスする。最近では、クローニングという過程が必要でないためより簡便で、さらに対立遺伝子の塩基配列を同時に決定できるというメリットもあるためPCR産物を直接シーケンスするダイレクトシーケンス法がよく用いられるようになってきている。しかしながら、本法では、cDNAやDNA全体の塩基配列を決定することが必要でありコ

表1 遺伝子診断法

1) サザンブロッティング法を用いた遺伝子診断
a) 直接的診断法
制限酵素認識部位を変化させる塩基置換
サザンブロッティング法で検出できるほど大きな塩基の挿入・欠失
サザンブロッティング法で検出できる反復配列数の変化
b) 間接的診断法
多型マーカーの利用
制限酵素断片長多型(RFLP)
超可変的反復配列数(VNTR)
マイクロサテライト多型
2) PCRを用いた遺伝子変異の検出
a) 既知の遺伝子変異の検出
対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション法
対立遺伝子特異的増幅法
制限酵素切断法
ミスマッチプライマーを用いた制限酵素切断法
b) 未知の遺伝子変異の検出法
RNase切断法
PCR-SSCP法
ダイレクトシーケンス

ストや時間の問題がある。このため、PCR-SSCP法²⁾により変異の部位をあらかじめスクリーニングし、その部位をシーケンスする方法もよく用いられている。一本鎖DNAは非変性条件下ではDNAの塩基配列に依存した高次構造をとっている。一塩基置換によってもこの高次構造は変化するために、非変性条件下での電気泳動では異なった移動度を示し、PCR-SSCP法では一塩基置換の有無を検出できる(図1)。

既に同定されている遺伝子変異の有無の検索、変異遺伝子が同定されている患者家系内での同胞例の診断や保因者の検索、シーケンス法により同定された遺伝子変異の確認などのためによく用いられるのが、簡便な制限酵素切断法である。遺伝子変異により制限酵素の認識部位が変化する場合には、まずPCR法により目的とする

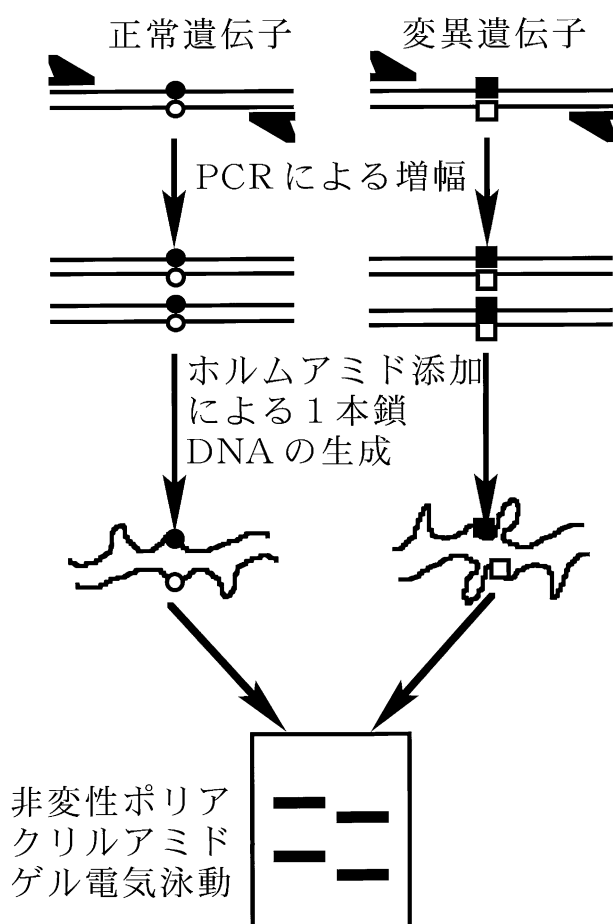


図1 PCR-SSCP法の原理

PCR法により検討対象のDNAを増幅し、ホルムアミド添加により一本鎖DNAを生成する。生成された一本鎖DNAは非変性条件下では塩基配列に依存した高次構造をとる。このため、一塩基置換でもあればその高次構造が変化し、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動において高次構造の違いにより移動度に差が見られ遺伝子変異の有無が検出できる。

遺伝子変異を含む遺伝子を増幅した後に、PCR産物を適当な制限酵素で切断し、電気泳動を行う。制限酵素認識部位が存在する場合には、PCR産物は切断されるが、存在しない場合には切断されない。ホモ接合体の場合にはすべてのPCR産物が切断されるか全く切断されないかであるが、ヘテロ接合体の場合には半分のPCR産物が切断されるだけであり、保因者の診断も可能である(図2A)。しかしながら、遺伝子変異によりいつも制限酵素認識部位が変化するわけではない。実際、制限酵素認識部位を変化させる遺伝子変異の方が稀である。そこで、ミスマッチプライマーを用いたPCRによって人工的に制限酵素の認識部位を導入する方法⁴が用いられる。遺伝子変異の近くにPCRプライマーをデザインするが、

この際に変異塩基配列または正常塩基配列の場合に制限酵素の認識部位ができるように、プライマーにミスマッチ部分を作成する。このプライマーを用いてPCRを行うと、PCR産物に新たな制限酵素認識部位が作り出され、遺伝子変異により制限酵素認識部位が変化する場合と同様、PCR産物を制限酵素で切断することにより、遺伝子変異の有無を検出することができるようになる(図2B)。その他、既知の遺伝子変異を検出する方法としては、対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション法⁵や対立遺伝子特異的増幅法⁶などがあるが、これらの方法はやや煩雑であり、多量の検体を検査する場合など、その状況に応じて用いられている。

遺伝子診断の利点(表2)

遺伝子診断の最も大きな利点は、極めて明確な結果が得られる点である。従来行われていた診断法では、正常と患者との間には境界領域が存在するため診断が困難な場合がある。これに対して遺伝子診断では、疾患の病因あるいは関連遺伝子に変異が存在するかしないかで診断可能であり、境界領域が存在しないために明確に判断することが可能である。第2の利点は、個体を形成する細胞はすべて同じ遺伝子構成を有するため、検体として用いる組織や細胞は核さえあればその種類を問わないという点である。つまり、従来の診断法では患者に対して侵襲の大きい検査が必要な疾患であっても、遺伝子診断では採血という極めて侵襲の少ない方法で診断が可能である。このことと関連して現在よく用いられているPCR法を用いれば、極めて微量な検体でも診断が可能なおとも利点の一つである。遺伝子診断法のもう一つの利点は、個体のあらゆる時期において遺伝子構成は変化しないため、出生前診断や症状が出現する前においても診断(発症前診断)が可能なおことである。また、遺伝子情報は4種類の核酸塩基からなり、遺伝子変異はこれらの塩基の

表2 遺伝子診断の利点

- | |
|-----------------------------|
| 1) 結果が明確 |
| 2) 人生のあらゆる時期に診断が可能 |
| 3) 原因遺伝子が発現していない細胞を用いても診断可能 |
| 4) 方法が普遍的 |
| 5) 少量の検体で可能 |
| 6) 検体が非常に安定 |
| 7) 病因が不明の場合も診断可能 |

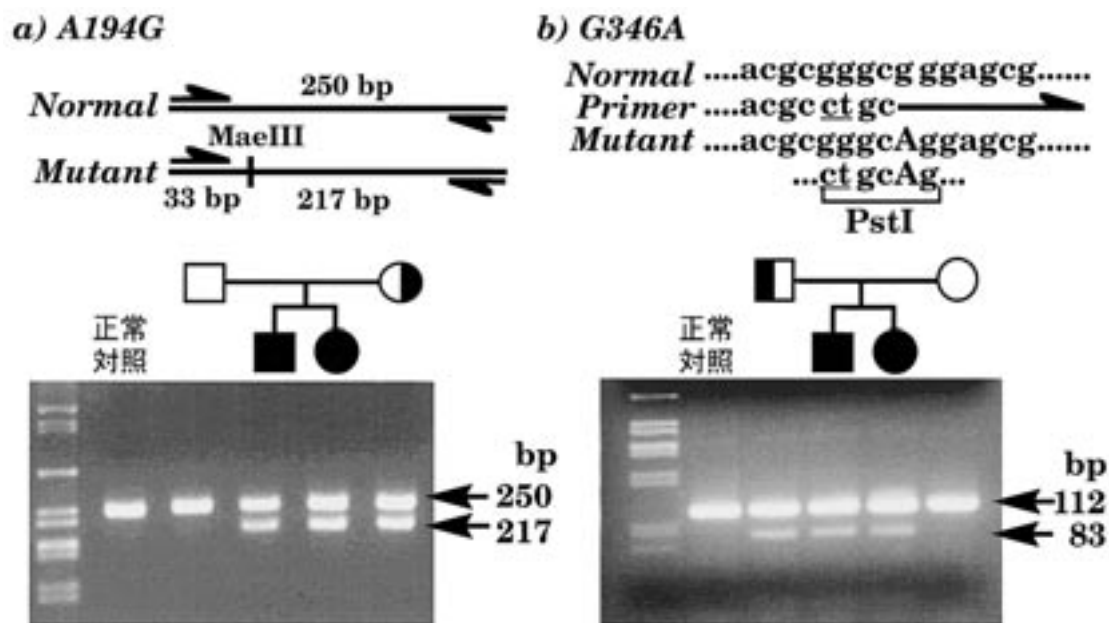


図2 制限酵素切断法によるホモシスチン尿症の1家系における遺伝子診断³⁾

シーケンスにより患者はシスタチオン合成酵素遺伝子の A194G と G346A のコンバウンドヘテロ接合体であることが確認され、これらの変異の家系内検索を行った。

A) A194G の変異により新たに制限酵素 Mae III の認識部位ができるため、PCR 法により変異部分を含むゲノム DNA を増幅後、PCR 産物を Mae III で切断した。患者である兄妹と母親では PCR 産物が切断され、この遺伝子変異のヘテロ接合体であることが確認された。

B) G346A の変異では制限酵素認識部位は変化しないため、変異遺伝子において制限酵素 Pst I の認識部位ができるように、図の下線部のミスマッチ部分 (gg ct) をもつミスマッチプライマーを作成した。このプライマーを用いて変異部分を含むゲノム DNA を PCR 法により増幅後、PCR 産物を Pst I で切断した。患者である兄妹と父親では PCR 産物が切断され、この遺伝子変異のヘテロ接合体であることが確認された。

欠失、挿入、置換のいずれかである。したがって、これらの組み合わせさえ検出できれば、対象疾患が何であれ同様の手技を用いて診断が可能であり、遺伝子診断の手技・手法が疾患の種類を問わず普遍的であることも利点である。さらに、遺伝子診断の対象である DNA は非常に安定であるため、患者が亡くなっているにもかかわらず DNA が抽出できるサンプルが残っていれば診断可能なことも利点であると考えることができる。

遺伝子診断の問題点 (表 3)

遺伝子診断は、遺伝子変異に基づく遺伝性疾患などの

表3 遺伝子診断の主な問題点

- | |
|---|
| 1) 遺伝子変異が見出されなかった場合正常か?
(false negative) |
| 2) 見いだされた遺伝子変異が病因か? (false positive) |
| 3) 倫理的には? |
| 4) 診断後のサポート体制は十分か? |

診断法としては極めて理にかなった方法であり、上述したような多くの利点がある。しかしながら、その一方でいくつかの問題点も存在していることを忘れてはならない。この中で一番問題となるのが、遺伝子診断ではすべての患者を診断することができない、すなわち、最も確実と考えられるシーケンス法でさえ病因遺伝子変異のすべてを検出することはできないということである。現在、遺伝子診断において解析されているのは、ほとんどの場合蛋白翻訳領域とエクソン/イントロン境界部分であり、イントロン部分や調節遺伝子領域を含む病因遺伝子全体が解析されているわけではない。また、解析対象となっている遺伝子以外の他の遺伝子が、その疾患の発症に関連している可能性も否定することはできない。したがって、病因遺伝子変異が見出された場合には、患者を確定診断することができるが、遺伝子変異が見出されなかったにすぎず、患者がその疾患でないとは断言することはできない。もう一つの問題点は、新たな遺伝子変異が見いだされた場合には、それがアミノ酸置換を伴ってい

ても、その遺伝子変異が遺伝子産物の機能に影響を及ぼさない正常多型である可能を否定できないことである。この場合、遺伝子変異による機能異常を明らかにするための煩雑な発現実験なしにはそれが病因遺伝子変異であると断言できず、臨床の面から考えると非常に大きな問題である。実際、我々はピルビン酸脱水素酵素異常症において、病因遺伝子変異と報告されていた遺伝子変異が正常多型であった例を経験⁷⁾している。また、従来考えられていたように疾患と病因遺伝子が必ずしも1対1で対応していない例が存在することが最近明らかになってきた⁸⁻¹⁰⁾。同一遺伝子の変異であっても変異の部位、種類によっては臨床的に異なる疾患であり、遺伝子変異が同定されてもその変異からはどの疾患であるか確定診断することが困難な場合が存在することも問題点としてあげることができる。最後に、遺伝子診断によって可能となった出生前診断や発症前診断は、常に倫理的な問題を内包しており、現在のわが国ではそのサポート体制が十分でないことも問題である。

おわりに

遺伝子診断には多くの利点が存在するものの、現時点では解決すべき問題点も多く存在している。このような利点と問題点を考え合わせてみたとき、すでに病因遺伝子変異が同定されている家系での同胞例の診断、保因者診断や出生前診断などでは遺伝子診断は非常に有用な診断方法である。しかし、新たに発見された患者での診断は、まず従来行われていた診断法による診断を優先し、これらの診断法で診断が困難なあるいは不可能な場合に遺伝子診断を考慮すべきではないかと考える。

文 献

- 1) 伊藤道徳：DNA 診断の基礎知識 B．診断法．小児疾患と DNA 診断（阿部敏明，黒田泰弘 編），三輪書店，東京，1994，pp.13-22
- 2) Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K.: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5 : 874-879, 1988
- 3) Chen, S., Ito, M., Saijo, T., Naito, E., et al: Molecular genetic analysis of pyridoxine-nonresponsive homocystinuric siblings with different blood methionine levels during the neonatal period. *J. Med. Invest.*, 46 : 186-191, 1999
- 4) Chen, J., Viola, M. V.: A method to detect *ras* point mutations in small subpopulations of cells. *Anal. Biochem.*, 195 : 51-56, 1991
- 5) Wallence, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J., et al: Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to $\Phi\chi$ 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucl. Acids Res.*, 6 : 3543-3557, 1979
- 6) Newton, C. R., Graham, A., Heptinstall, L. E., Powell, S. J., et al: Analysis of any mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucl. Acids Res.*, 17 : 2503-2516, 1989
- 7) Matsuda, J., Ito, M., Naito, E., Yokota, I., et al: DNA diagnosis of pyruvate dehydrogenase deficiency in female patients with congenital lactic acidemia. *J. Inher. Metab. Dis.*, 18 : 534-546, 1995
- 8) Jabs, E. W., Li, X., Scott, A. F., Meyers, G., et al: Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nature Genet.*, 8 : 275-279, 1994
- 9) Meyers, G. A., Day, D., Goldberg, R., Daentl, D. L., et al: FGFR2 exon IIIa and IIIc mutations in Crouzon, Jackson-Weiss, and Pfeiffer syndromes: evidence for missense changes, insertions, and a deletion due to alternative RNA splicing. *Am. J. Hum. Genet.*, 58 : 491-498, 1996
- 10) Anderson, J., Burns, H. D., Enriquez-Harris, P., Wilkie, A. O. M., et al: Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand. *Hum. Molec. Genet.*, 7 : 1475-1483, 1998

DNA diagnosis ; advantages and weak points

Michinori Ito

Department of Pediatrics, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan

SUMMARY

In recent years, many disease-related genes has been found with the development of molecular biological technique and molecular genetical analyses in patients with these diseases have been performed in clinical medicine. DNA diagnosis, diagnosis by detection of the mutation in disease-related genes, has a lot of advantages compared to usual diagnostic method. However, DNA diagnosis still has several weak points in clinical medicine. The first weak point is that we can not diagnose the patient as normal even when no mutation is found by DNA analysis. The second weak point is that functional analysis of the gene product, which is hard in clinical medicine, is necessary to confirm the mutation as the pathogenic mutation when the new mutation is found in the patient. Finally, it is also the problem that the sufficient supporting system for the patients after DNA diagnosis is not established in Japan. Then, it is important that not only advantages but also these weak points are fully considered before DNA diagnosis.

Key words : DNA diagnosis, advantage, weak point